

**Atividade Antimicrobiana do Óleo
Essencial de Manjerição contra Patógenos
e Deterioradores de Alimentos**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria Tropical
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 67

Atividade Antimicrobiana do Óleo Essencial de Manjeriço contra Patógenos e Deterioradores de Alimentos

*Terezinha Feitosa Machado
Nádia Accioly Pinto Nogueira
Rita de Cássia Alves Pereira
Civita Teixeira de Sousa
Valéria Chaves Vasconcelos Batista*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Unidade responsável pelo conteúdo e edição

Embrapa Agroindústria Tropical
Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici
CEP 60511-110 Fortaleza, CE
Fone: (85) 3391-7100
Fax: (85) 3391-7109
Home page: www.cnpat.embrapa.br
E-mail: vendas@cnpat.embrapa.br

Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente: *Marlon Vagner Valentim Martins*
Secretário-Executivo: *Marcos Antonio Nakayama*
Membros: *José de Arimatéia Duarte de Freitas, Celli Rodrigues*
Muniz, Renato Manzini Bonfim, Rita de Cassia Costa
Cid, Rubens Sonsol Gondim, Fábio Rodrigues de Miranda

Revisão de texto: *Marcos Antonio Nakayama*
Normalização bibliográfica: *Edineide Maria Machado Maia*
Editoração eletrônica: *Marcos Antonio Nakayama*
Foto da capa: *Rita de Cássia Alves Pereira*

1ª edição (2012): versão eletrônica

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Agroindústria Tropical

Atividade antimicrobiana do óleo essencial de manjerição contra patógenos e deterioradores de alimentos / Terezinha Feitosa Machado... [et al.] – Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, 2012.

16 p.; 21 cm. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6543, 67).

1. *Ocimum micranthum*. 2. *Ocimum selloi*. 3. Segurança microbiológica. I. Machado, Terezinha Feitosa. II. Nogueira, Nádia Accioly Pinto. III. Pereira, Rita de Cássia Alves. IV. Sousa, Civita Teixeira de. V. Batista, Valéria Chaves Vasconcelos. VI. Série.

CDD 661.806

© Embrapa 2012

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	8
Resultados e Discussão	10
Conclusão	13
Referências	14

Atividade Antimicrobiana do Óleo Essencial de Manjeriço contra Patógenos e Deterioradores de Alimentos

Terezinha Feitosa Machado¹

Nádia Accioly Pinto Nogueira²

Rita de Cássia Alves Pereira³

Civita Teixeira de Sousa⁴

Valéria Chaves Vasconcelos Batista⁵

Resumo

Neste trabalho, foi avaliado o potencial antimicrobiano do óleo essencial de duas espécies de manjeriço (*Ocimum micranthum* e *O. selloi*). Para estabelecer esse potencial, foram utilizadas seis espécies bacterianas relacionadas à deterioração e segurança microbiológica de alimentos: *Listeria minocytogenes*, *L. innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*. Os métodos de difusão em ágar e microdiluição em caldo foram empregados para determinar a atividade antimicrobiana e a concentração inibitória mínima (CIM) de cada óleo para cada espécie microbiana. Os resultados mostraram que o óleo de ambas as espécies de *Ocimum* apresentam atividade contra todas as cepas microbianas

¹ Engenheira de alimentos, D.Sc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, terezinha.feitosa@embrapa.br

² Química industrial, D.Sc. em Bioquímica, professora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, acciolyufc@gmail.com

³ Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Fitotecnia/Plantas Medicinais, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, rita.pereira@embrapa.br

⁴ Engenheira de alimentos, mestranda em Engenharia Química pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, civitatsou@ig.com.br

⁵ Graduanda em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, valeriacvb@ig.com.br

testadas e que *S. aureus* foi a espécie microbiana mais sensível, apresentando os maiores halos de inibição e os menores valores da CIM.

Termos para indexação: *Ocimum micranthum*; *Ocimum selloi*; segurança microbiológica.

Antimicrobial Activity of Essential Oil of Basil against Pathogens and Food Spoilage

Abstract

In this study, the antimicrobial potential of essential oil of two basil species (Ocimum micranthum and O. selloi) was evaluated. To establish this potential, six bacterial species related to spoilage and microbiological safety of foods, Listeria minocytogenes, L. innocua, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Salmonella choleraesuis were used. The agar diffusion and broth microdilution methods were employed to determine the antimicrobial activity and minimum inhibitory concentration (MIC) of each oil for each microbial species. The results showed that the oil of both Ocimum species exhibit activity against all microbial strains tested and that S. aureus was the most sensitive microbial specie showing the highest inhibition zone and the smallest values of CIM.

Index terms: Ocimum micranthum; Ocimum selloi; microbiological safety

Introdução

Agentes antimicrobianos, incluindo os conservantes de alimentos, têm sido utilizados para inibir o crescimento de bactérias de origem alimentar e estender a vida de prateleira de alimentos processados (OUSSALAH et al., 2006). Muitas plantas e seus extratos têm demonstrado possuir efeito antimicrobiano e podem servir como fonte natural dessas substâncias. Extratos de plantas podem apresentar atividade antimicrobiana em seus óleos essenciais, devido aos componentes com amplo espectro de atividade contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (BOZIN et al, 2006).

As pesquisas com óleos essenciais têm aumentado e atraído a atenção nos círculos acadêmicos e industriais por vários motivos. Além das propriedades antimicrobianas, os óleos essenciais ou seus componentes apresentam propriedades antivirais, antitoxigênicas, antiparasitárias e inseticidas possivelmente relacionadas com a função desses compostos nas plantas (BURT, 2004). Outros aspectos justificam o interesse por esses compostos, como a atual tendência ao “consumo verde” caracterizado pela procura por alimentos com menos aditivos sintéticos e produtos com menor impacto sobre o meio ambiente; a recomendação mundial para redução do consumo de sal e a necessidade de técnicas alternativas para garantir a qualidade e a segurança dos alimentos (HOLLEY; PATEL, 2005).

Doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados com bactérias patogênicas têm um grande impacto na economia e na saúde pública mundial (GANDHI; CHIKINDAS, 2007). Estima-se que, a cada ano, cerca de 30% da população de países industrializados sofrem de doenças de origem alimentar. *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* são os principais agentes responsáveis por surtos, casos e mortes associados ao consumo de alimentos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

Como os óleos essenciais e seus constituintes são extensivamente utilizados como flavorizantes em uma grande variedade de alimentos, sua aplicação no controle de microrganismos patogênicos pode reduzir o risco de surtos de origem alimentar e garantir aos consumidores alimentos seguros (BURT, 2007).

O gênero *Ocimum* L. (*Lamiaceae*), comumente denominado de manjerição, compreende cerca de 160 espécies distribuídas na África, Ásia e América do Sul (GUPTA, 1994), muitas das quais são usadas como especiarias e na medicina popular (GRAYER et al., 1996). Seu óleo essencial é constituído de substâncias como o estragol, eugenol, metileugenol, citral, linalol, geraniol e timol, que lhe confere atividades biológicas desejadas como conservantes naturais para uso em alimentos (BASSOLE et al. 2005; PAULA et al., 2003; GANIYU, 2008;). Todavia, a aplicação de óleo essencial de planta como conservante em alimentos requer o estabelecimento de condições especiais, tais como a determinação da sensibilidade do agente microbiano e a determinação da concentração bactericida mínima (MOREIRA et al, 2005). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e determinar a concentração inibitória mínima do óleo essencial de duas espécies de *Ocimum* sobre microrganismos relacionados a doenças de origem alimentar e qualidade de alimentos.

Material e métodos

Óleo essencial

Os óleos essenciais utilizados neste trabalho foram obtidos a partir de folhas e flores frescas de *Ocimum micranthum* e *O. selloi* provenientes do Campo Experimental da Embrapa Agroindústria Tropical, localizado no município de Paraipaba, Ceará. O material vegetal foi submetido à hidrodestilação por 4h, utilizando um aparelho do tipo Clevenger. Os óleos essenciais separados por centrifugação foram submetidos à

secagem com Na_2SO_4 , transferidos para frascos de vidro âmbar com tampa rosqueada e armazenados a 2 °C até o momento das análises (CRAVEIRO et al., 1976).

Manutenção das culturas bacterianas e preparo do inóculo

As espécies bacterianas utilizadas foram *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. Todas as espécies foram mantidas a -80 °C em caldo BHI com 20% de glicerol. As culturas de trabalho foram preparadas pelo subcultivo de 100 μL de cada cultura estoque em 9 mL de caldo infusão de cérebro e coração (caldo BHI, Merck) e incubadas a 35 °C até atingirem fase exponencial de crescimento (12h). Após esse período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em solução salina 0,85% estéril, de modo a se obter uma turbidez comparável à do tubo 0,5 da escala de McFarland (Biomérieux Inc.), resultando em uma suspensão microbiana com aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi determinada utilizando o método de difusão em ágar descrito pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (ANVISA, 2003a). Suspensões microbianas foram semeadas na superfície de ágar Mueller-Hinton (Difco). Com um perfurador estéril, foram feitos poços de 5 mm de diâmetro interno, aos quais foram adicionados 25 μL de cada óleo essencial em concentrações binárias preparadas em Tween 80 1%. As placas inoculadas foram mantidas em temperatura ambiente durante 30 minutos, para permitir a difusão do óleo e, posteriormente, incubadas em 35 °C/18h. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela medida do diâmetro dos halos de inibição do crescimento microbiano em torno dos poços. Halos com diâmetros iguais ou superiores a 7,0 mm foram considerados indicativos de sensibilidade bacteriana aos óleos. Soluções estéreis de Tween 80 (VETEC) 1% e de amicacina

(Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 1,2 mg/mL foram usadas como controles negativo e positivo do experimento, respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM dos óleos essenciais para as cepas bacterianas foi determinada pelo método da microdiluição em caldo de cultura (ANVISA, 2003b) com modificações. Suspensões bacterianas com densidade celular ajustada para 10^8 UFC/mL, como descrito anteriormente, foram diluídas em caldo BHI estéril, para aproximadamente 10^6 UFC/mL. Aos poços-teste, de placas de microdiluição com 96 poços, foram adicionados 80 μ L das suspensões microbianas, 100 μ L de caldo BHI (Merck) e 20 μ L de diluições binárias dos óleos provenientes de folhas e flores. Nos poços-controle, foram adicionados 80 μ L das suspensões microbianas, 100 μ L de caldo BHI e 20 μ L de solução estéril de amicacina 1,2 mg/mL ou de Tween 80 1%. Após incubação a 35 °C por 24 horas, a menor concentração dos óleos na qual não foi evidenciado crescimento microbiano foi determinada como CIM.

Resultados e discussão

As tabelas 1 e 2 mostram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *O. micranthum* e *O. selloi* contra microrganismos patogênicos e deterioradores de alimentos. Os óleos essenciais provenientes das folhas de *O. micranthum* e das flores de *O. selloi* apresentaram atividade contra todas as espécies microbianas testadas. Os resultados obtidos pelo método de difusão em ágar (Tabela 1), seguidos pela medida da CIM (Tabela 2), indicam que *S. aureus* é a espécie microbiana mais sensível, apresentando os maiores halos de inibição (19,3 mm – 17,3 mm) e os menores valores da CIM (0,3 mg/mL – 1,47 mg/mL). As demais espécies (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. choleraesuis*) apresentam menos sensibilidade à presença dos óleos essenciais pelos menores halos de inibição (9,5 mm – 14,3 mm) e maiores valores da CIM (0,32 mg/mL – 6,17 mg/mL) exibidos.

Tabela 1. Atividade antibacteriana do óleo essencial de folhas e inflorescência de duas espécies de *Ocimum* contra microrganismos patogênicos e deterioradores de alimentos.

Microrganismo	Halo de inibição (mm/mL)			
	<i>Ocimum micranthum</i>		<i>Ocimum selloi</i>	
	folha	flor	folha	flor
<i>Staphylococcus aureus</i>	15,5 ± 0,7 ^{aA}	19,3 ± 1,1 ^{bA}	12,8 ± 3,2 ^{aA}	17,3 ± 1,8 ^{abA}
<i>Escherichia coli</i>	12,5 ± 2,1 ^{aB}	0 ^{bB}	0 ^{bB}	12,8 ± 1,1 ^{aB}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10,5 ± 0,5 ^{aBC}	0 ^{bB}	9,3 ± 0,4 ^{aA}	11,5 ± 2,8 ^{aB}
<i>Salmonella choleraesuis</i>	9,5 ± 0,7 ^{aC}	0 ^{bB}	0 ^{bB}	14,3 ± 4,6 ^{aAB}

Os valores são médias ± desvio padrão de dois experimentos. Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferenças da procedência (folha e flor) do óleo. Letras maiúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças entre microrganismos.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de folhas e flores de espécies de duas *Ocimum* contra microrganismos patogênicos e deterioradores de alimentos.

Microrganismo	Halo de inibição (mm/mL)			
	<i>O. micranthum</i>		<i>O. selloi</i>	
	folha	flor	folha	flor
<i>S. aureus</i>	0,32	0,38	1,47	0,7
<i>E. coli</i>	0,32	3,90	5,9	1,41
<i>P. aeruginosa</i>	1,29	6,17	2,95	1,41
<i>S. choleraesuis</i>	0,32	3,90	2,95	2,91

A análise de variância revelou que ambas as procedências do óleo (folha e flor) e ambas as espécies microbianas mostraram efeito significativo sobre a atividade antimicrobiana dos óleos ($p < 0,05$). Em relação aos microrganismos, essa diferença pode estar associada à estrutura externa da parede celular, que difere entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BURT, 2004). Em relação à procedência, essa diferença pode ser atribuída à composição química do óleo, que

difere pela formação de substâncias antibacterianas e seus precursores nas diferentes partes da planta (JERKOVIC et al, 2001; MORAIS, 2009). Relatos anteriores mostram que mudanças na composição química, localização geográfica, sazonalidade e métodos de extração afetam diretamente as atividades biológicas dos óleos essenciais (CELIK TAS et al, 2007; VAN VUUREN, 2007).

Muitos testes foram realizados avaliando a ação de óleos essenciais de plantas contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. Farag et al. (1989) examinaram a atividade antimicrobiana dos óleos de sálvia, cominho, cravo, tomilho e alecrim contra três espécies de bactérias Gram-negativas (*P. fluorescens*, *E. coli*, e *Serratia marcescens*) e quatro espécies Gram-positivas (*S. aureus*, *Micrococcus* spp., *Sarcina* spp. e *B. subtilis*). Relataram que os óleos essenciais de sálvia e de alecrim apresentaram pouco ou nenhum efeito contra bactérias Gram-negativas, mas que o óleo de cominho foi moderadamente eficaz contra esse grupo. Os óleos essenciais de cravo e tomilho mostraram-se altamente efetivos contra *S. aureus* e *Micrococcus* spp., enquanto apenas pequenas zonas de inibição foram relatadas para bactérias Gram-negativas. Em geral, bactérias Gram-negativas foram mais resistentes aos óleos essenciais do que as bactérias Gram-positivas.

Oussalah et al. (2006) também avaliaram o efeito inibitório de 60 diferentes óleos essenciais contra *Pseudomonas putida*, espécie microbiana associada à deterioração de carnes. Evidenciaram que o efeito antimicrobiano variou entre os óleos e que concentrações entre 0,006% e 0,4% foram necessárias para prevenir o crescimento detectável de *P. putida*, enquanto concentrações entre 0,025% e 0,8% foram necessárias para a completa destruição do crescimento microbiano.

Suppakul et al. (2003) demonstraram a atividade antimicrobiana do óleo essencial *Ocimum basilicum* contra uma ampla gama de microrganismos. Posteriormente, Wannissorn et al. (2005) relataram moderada atividade antibacteriana do óleo dessa espécie. Bozin et al. (2006) mostraram que cepas bacterianas Gram-positivas apresentaram maior sensibilidade ao referido óleo.

Os resultados obtidos neste estudo assemelham-se aos citados da literatura para diferentes óleos essenciais. Contudo, novos estudos devem ser conduzidos, para avaliar a eficácia prática desses óleos contra o crescimento microbiano em diferentes condições de substratos, processamentos e armazenamento específicos de alimentos.

Conclusão

Os óleos essenciais de *O. micranthum* e *O. selloi* apresentam atividade antimicrobiana contra microrganismos associados à qualidade e segurança microbiológica dos alimentos.

Referências

ANVISA. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico**: norma aprovada. 6.ed. 2003b (NCCLS. Document, M7-A6, v.23, n. 2.). Uma norma de aplicação global desenvolvida mediante o processo consensual do NCCLS. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_publicacoes_bac_cresc.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2012.

ANVISA. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão**: norma aprovada. 8. ed. 2003a. (NCCLS. Document, M2-A8, v. 23 n.1.) Norma de aplicação global desenvolvida através do processo consensual do NCCLS. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_public_disco_difusao.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2012.

BASSOLE, I.; NEBIE, R.; SAVADOGO, A.; OUATTARA, C.T.; BARRO, N.; TRAORE, S.A. Composition and antimicrobial activities of the leaf and flower essential oils of *Lippia chevalieri* and *Ocimum canum* from Burkina Faso. **African Journal of Biotechnology**, on-line, v.4, n.10, p.1156 – 1160, 2005.

BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SIMIN, N.; ANACKOV, G. Characterization of the volatile composition of essential oil of some lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v.54, n. 5 , p.1822-1828, 2006.

BURT, S. A. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.94, n.3, p.223-253, 2004.

BURT, S. A. **Antibacterial activity of essential oils:** potential applications in food. 2007. 136 f. Ph.D. thesis. Institute for Risk Assessment Sciences, Division of Veterinary Public Health. Utrecht University. Utrecht. The Netherlands.

CELIK TAS, O. Y.; KOCABAS, E. E. H.; BEDIR, E.; SUKAN, F. V.; OZEK, T.; BASER, K. H. C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, London, v.100, n.2, p.553-559, 2007.

CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J.; ALENCAR, J.W.A.. A simple and inexpensive steam generator for essential oils extraction. **Journal of Chemical Education**, Easton, v.53, n.10, p.652. 1976.

FARAG, R.S., DAW, Z.Y., HEWED, F.M., EL-BAROTY, G.S.A., Antimicrobial activity of some egyptian spice oils. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.52, n.9, p.665-667, 1989.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.113, n.1, p. 1-15, 2007.

GANIYU, O. Antioxidative potential of *Ocimum gratissimum* and *Ocimum canum* leaf polyphenols and protective effects on some pro-oxidants induced lipid peroxidation in rat brain: an *in vitro* study. **American Journal of Food Technology**, New York, v.3, n.5, p.325-334, 2008.

GRAYER, R.J.; KITE, G.C.; GOLSDSTONE, F. J.; PATON, B. PUTLEVSKY, E. Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. **Phytochemistry**, New York, v.43, n.5, p.1033-1039, 1996.

GUPTA R. Basil (*Ocimum* spp.). G-15 Gene Banks for Medicinal and Aromatic Plants. **Newsletter**, n.5/6, p.1-3, 1994.

HOLLEY, R.A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, London, v.22, n. 4, p.273-292, 2005.

JERKOVIC, I.; MASTELIC. J.; MILOS, M. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia. **International Journal of Food Science and Technology**, Amsterdam, v.36, n.6, p.649-654, 2001.

MORAIS, L. A. S. Influ ncia dos fatores abi ticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF; v. 27, n. 2, p 4050-4063, 2009. Suplemento.

MOREIRA, M. R.; PONCE, A. G.; DEL VALLEA, C. E.; ROURAB, S. I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT – Food Science and Technology**, v.38, n.5, p.565-570, 2005.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Science**, Barking, v.73, n.2, p.236-244, 2006.

PAULA, J. P de ; CARNEIRO, M. R. G.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v.88, n. 2/3, p. 253-260, 2003.

SUPPAKUL, P., MILTZ, J., SONNEVELD, K., & BIGGER, S. W. Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packing. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v.51, n.11, p.3197-3207, 2003.

VAN VUUREN, S. F.; VILJOEN, A. M.; OZEK, T.; DEMIRICI, B.; BASER, K. H. C. Seasonal and geographical variation of *Heteropyxis natalensis* essential oil and the effect thereof on the antimicrobial activity. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v.73, n.3, 441-448, 2007.

WANNISSORN, B.; JARIKASEM, S.; SIRIWANGCHAI, T.; THUBTHIMTHED, S. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. **Fitoterapia**, v.76, n.2, p.233-236, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food safety and foodborne illness**,Geneve, 2007. (WHO.Fact sheet 237, revised march). Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>> . Acesso em: 16 nov. 2012.



Agroindústria Tropical

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

